

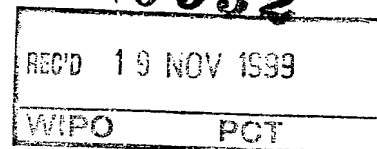
URAD REPUBLIKE SLOVENIJE ZA INTELEKTUALNO LASTNINO

IB 99/ISS3

097720952

P o t r d i l o

C e r t i f i c a t e



Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino potrjuje, da je priloženi dokument istoveten z izvirnikom prijave patenta, kot sledi:

Slovenian Intellectual Property Office hereby certifies that the document annexed hereto is a true copy of the patent application, as follows:

(71) Prijavitelj (*Applicant*):

LEK, TOVARNA FARMACEVTSKIH IN KEMIČNIH IZDELKOV, d.d.,
Verovškova 57, 1526 LJUBLJANA, Slovenija

(22) Datum prijave (*Application Date*):

18.9.1998 (18.sep.1998)

(54) Naziv (*Title*):

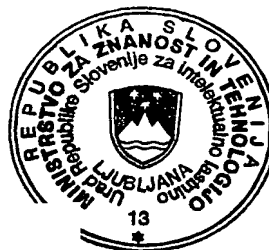
Postopek za pridobivanje inhibitorjev HMG-CoA reduktaze

(21) Številka prijave (*Application No.*):

P-9800241

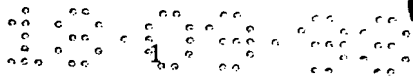
Ljubljana, 29.10.1999

Helena Zalaznik
višja svetovalka



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



LEK, tovarna farmacevtskih in kemičnih izdelkov, d.d.

Naziv izuma

Postopek za pridobivanje inhibitorjev HMG-CoA reduktaze

C 07D 309/30

Področje tehnike

Lovastatin, pravastatin, simvastatin, mevastatin, atorvastatin, njihovi derivati in analogi so poznani kot inhibitorji HMG-CoA reduktaze in se uporabljajo kot antihiperholesterolemiki. Večino jih proizvajajo s fermentacijo z mikroorganizmi različnih vrst, ki pripadajo rodovom *Aspergillus*, *Monascus*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Mucor* ali *Penicillium*, nekateri pa so rezultat obdelave fermentacijskih produktov z metodami kemijske sinteze oziroma so produkti totalne kemijske sinteze.

Čistost aktivne učinkovine je pomemben faktor pri proizvodnji varnega in učinkovitega zdravila, še posebej, če je potrebno jemanje zdravila na daljše obdobje, kot je to primer pri zdravljenju ali preprečevanju visokega nivoja holesterola v krvi. Akumulacija nečistoč iz zdravil z manjšo čistostjo lahko povzroča mnoge stranske učinke med zdravljenjem.

Predloženi izum se nanaša na nov industrijski postopek za izolacijo inhibitorjev HMG-CoA reduktaze z uporabo takoimenovane "displacement" kromatografije ali kromatografije izpodrivanja. Uporaba izuma nam omogoča pridobivanje inhibitorjev HMG-CoA reduktaze visoke čistosti, ob visokih izkoristkih, čim nižjih stroških in z ugodno ekološko bilanco.

Stanje tehnike

Postopki za izolacijo in čiščenje antihiperholesterolemikov, ki so opisani v starejših patentnih prijavah zaobsegajo različne kombinacije ekstrakcijskih,

kromatografskih, laktonizacijskih in kristalizacijskih metod. Čistost končnega produkta proizvedenega po teh postopkih sicer ustreza USP standardom, vendar pa so dobitki željenega produkta relativno nizki. Poleg tega pa zahtevajo velike količine organskih topil in tem količinam primerno veliko opremo.

Izolacijski postopek opisan v patentni prijavi WO 92/16276 ponuja rešitev za pridobivanje inhibitorjev HMG-CoA reduktaz čistosti večje kot 99.5%, ob uporabi industrijske HPLC (high performance liquid chromatography-tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) opreme. V WO 92/16276 je surov inhibitor HMG-CoA reduktaze s približno 85% ali višjo čistostjo raztopljen v organskem topilu oziroma v raztopini organskega topila in vode. pH mešanice nato naravnamo na vrednosti med 2 in 9 ter jo naneseemo na HPLC kolono. Po tem, ko zberemo kromatografski vrh z inhibitorjem HMG-CoA reduktaze, ki nas zanima, odstranimo del topila in dodamo vodo, alternativno lahko odstranimo dve tretini mešanice topila in pustimo inhibitor HMG-CoA reduktaze da kristalizira. Čistost produkta dobljenega po tem postopku je na koncu najmanj 99.5% ob dobitku okoli 90%.

Metoda opisana v WO 92/16276 sicer omogoča pridobivanje inhibitorjev HMG-CoA reduktaze visoke čistosti in z relativno visokimi izkoristki, njena slaba stran pa so relativno majhne količine substance, ki jo je možno naenkrat nanesti na HPLC kolono, v primerjavi s klasičnimi kromatografskimi kolonami. Z majhnimi nanosi je povezano tudi veliko število ponovitev operacije izolacije, da lahko pridobimo zadostne količine željene substance, in posledično velika količina uporabljenih topil, kar rezultira v višjih proizvodnih stroških.

Metoda kromatografija izpodrivanja, ki je osnova našega izuma, se od predhodno uporabljenih kromatografskih metod bistveno razlikuje.

Kromatografija izpodrivanja temelji na tekmovanju komponent nanešenega vzorca za aktivna mesta na stacionarni fazi. Posamezne komponente vzorca izpodrivajo ena drugo kot vlak, "izpodrivalo"-(displacer), ki ima zelo visoko afiniteto do stacionarne faze, pa potiska celoten nanos po kolon, kar vodi v separacijo nanešenih komponent vzorca v enokomponentna področja, ki

potujejo z isto hitrostjo kot "izpodrivalo". Hkrati s čiščenjem poteka tudi koncentracija posameznih komponent.

Sam princip metode kromatografije izpodrivanja je relativno star, saj je znan že od leta 1943, vendar je bil zaradi pomankanja učinkovitih kolon v prakso prestavljen šele leta 1981 (Cs. Horvath et al., J. Chromatogr., 215 (1981) 295; J. Chromatogr., 330 (1985) 1; J. Chromatogr., 440 (1988) 157). V teh člankih so opisali analizno in preparativno ločevanje ter čiščenje biološko aktivnih peptidov in polimiksinških antibiotikov (polipeptid) s kromatografijo reverzne faze na način izpodrivanja. Za polimiksine so uporabljali oktadecilsilikagelne kolone 250 x 4,6 mm z velikostjo delcev 5 μ m, 10 %-ni acetonitril v vodi kot mobilno fazo ter različne tetraalkilamonijeve halogenide kot "izpodrivalo".

Tudi v kasnejših raziskavah s področja kromatografije izpodrivanja (S. M. Cramer et al., Enzyme Microb. Technol., 11 (1989) 74; Prep. Chromatogr., 1 (1988) 29; J. Chromatogr., 394 (1987) 305; J. Chromatogr., 439 (1988) 341; J. Chromatogr., 454 (1988) 1 (teoretična optimizacija); A. Felinger et al., J. Chromatogr., 609 (1992) 35 (teoretična optimizacija)) so uporabili podobne kolone; mobilna faza je bil metanol v fosfatnem pufru, "izpodrivalo" pa 2-(2-t-butoksietoksi)etanol (BEE) v acetonitrilu in Na-acetatu. Za vzorce so uporabili različne peptide, proteine in antibiotik cefalosporin C.

V patentu US 5.043.423 (27.08.1991) oz. EP 416.416 je opisana metoda za čiščenje nekaterih posebnih nižjemolekularnih (pod 1000 daltoni) peptidov (zlasti tuftsina in njegovih sintetičnih derivatov) z ionsko-izmenjalno kromatografijo izpodrivanja, kjer je SF kationsko-izmenjalna smola, transportno topilo je voda ali različne razredčene močne kisline, "izpodrivalo" (trietilentetraamonijeva sol) pa je v različnih koncentracijah. V še neobjavljeni patenti prijavi US 08/875.442 je opisana uporaba izpodrivalne kromatografije za izolacijo in čiščenje vankomicina.

Prikaz tehničnega problema

Doseganje visoke čistosti aktivne učinkovine je včasih v industrijskem merilu težavno, saj marsikatera tehnologija uporabna v laboratorijskem merilu v industrijskem merilu ni dovolj ekonomična, da bi bila njena uporaba upravičena, oziroma ne zadovoljuje okoljevarstvenih kriterijev. Zgoraj navedena dejstva silijo industrijo v iskanje novih in novih tehnologij, ki bi zagotavljale tako visoko kvaliteto proizvoda, kot tudi ekonomično in ekološko čisto proizvodnjo.

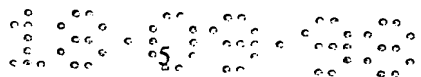
S predloženim izumom smo rešili pomankljivosti, ki so jih imeli postopki poznani iz starejših patentnih prijav in ostale literature, saj nam omogoča pridobivanje zelo čistih inhibitorjev HMG-CoA reduktaze, poleg tega je sam postopek čiščenja hiter, z visokimi izkoristki, v njem pa se uporabljajo majhne količine topil. Postopek je okolju prijazen, poleg tega pa tudi prostorsko in energetsko nezahteven, kar omogoča ekonomično proizvodnjo v industrijskem merilu.

Opis izuma

Predmet izuma je postopek čiščenja inhibitorjev HMG-CoA reduktaze s kromatografijo izpodrivanja, ki vključuje naslednje stopnje:

1. kondicioniranje kromatografske kolone z izbrano mobilno fazo,
2. nanos v mobilni fazi raztopljenega inhibitorja HMG-CoA reduktaze,
3. nanos "izpodrivala" za izpodrivanje inhibitorja HMG-CoA reduktaze iz kolone in lovljenje frakcij,
4. analiza frakcij s analitsko HPLC in združitev frakcij po kvaliteti,
5. regeneracija - spiranje kolone z zmesjo alkohol/voda, da bi eluirali "izpodrivalo".

Tako dobljene inhibitorje HMG-CoA reduktaze lahko iz mobilne faze izoliramo z liofilizacijo ali pa kot katero izmed alkalijskih oziroma



zemljoalkalijskih soli, ki jih pripravimo po postopkih, ki so že poznani iz stanja tehnike.

Frakcije, ki vsebujejo poleg nečistoč še precejšen delež inhibitorjev HMG-CoA reduktaze lahko vračamo v postopek, kar nam omogoča doseganje celokupnega izkoristka višjega od 95%.

Stacionarna faza je reverzna faza, in sicer je lahko naravna (silikageli z različno dolgimi alkilnimi verigami) ali pa je nek sintetični zamreženi polimer (iz stirena in divinilbenzena). Velikost delcev stacionarne faze je od 3 do nekaj 20 μm , najbolje med 7 in 15 μm .

Mobilna faza je lahko voda, raztopina acetonitril/voda in vodne raztopine nižjih alkoholov ter pufri razredčenih organskih, halogeniranih organskih ali anorganskih kislin, npr. mravljične, očetne, propionske, klorovodikove, borove, fosforjeve karbonatne, ali žveplove s kationi alkalijskih kovin, z amoniakom ali z amini. pH uporabljene mobilne faze je lahko med 4.5 in 8.5, prednostno med 6.5 in 8, pretok mobilne faze skozi kolono pa med 0.26 do 6.5 ml/(min cm^2), prednostno med 0.65 in 3.3 ml/(min cm^2). Po končani kromatografiji regeneriramo stacionarno fazo z 20-100 % nižjega alkohola v vodni raztopini.

"Izpodrivalo" je lahko:

- alkohol z vsaj C_4 -verigo (boljše rezultate dosežemo z n-alkoholi),
- oksi in dioksi alkoholi

Koncentracija "izpodrivala" v mobilni fazi se lahko giblje med 5 in 35 %, najbolje med 7 in 20 %.

Ker lahko strupeni metanol v mobilni fazi brez večjih težav zamenjamo z manj strupenim etanolom, oziroma vodo, je z enostavnejšim odstranjevanjem odpadnih topil ta izum v primerjavi s stanjem tehnike velika izboljšava tudi z ekološkega vidika.

Metoda HPLC analize čistosti inhibitorjev HMG-CoA reduktaze v posameznih frakcijah

Vzorec, ki ga želimo analizirati razredčimo 100 krat z mobilno fazo, ki vsebuje 20mM vodno raztopino NH_4HCO_3 z 18% acetonitrila. 10 μl tako pripravljenga vzorca naneseemo na Hypersil ODS kolono (Hypersil, Velika Britanija, velikost delcev 3 μm , velikost kolone 50 X 4.6 mm) za kromatografijo visoke ločljivosti. Kolono spiramo z mobilno fazo s pretokom 2 ml/min. Absorbanco merimo pri 235 nm. Iz razmerja med površinami posameznih vrhov v kromatogramu izračunamo HPLC čistost vzorca.

Predloženi izum prikazujejo, vendar v ničemer ne omejujejo naslednji primeri.

PRIMERI

Primer 1

Surovo natrijevo sol pravastatina (1.0 g, HPLC čistost 88%, vsebnost 85%) smo raztopili v 10 ml mobilne faze (destilirana voda), naravnali pH na 7 z vodno raztopino 0.2 M NaOH in filtrirali. Tako pripravljen vzorec smo nanegli na kolono Grom-Sil 120-ODS HE kolono (Grom Analytic+HPLC GmbH, Nemčija, velikost delcev 11 μm , velikost kolone 250 X 10 mm) za kromatografijo visoke ločljivosti. V nadaljevanju smo spirali kolono z mobilno fazo, ki vsebuje 7% dietilenglikol monobutyletra, s pretokom 1 ml/min. Absorbanco smo merili pri 260 nm, pri prvem porastu absorbcije pa smo pričeli zbirati frakcije po 0.5 ml. Dobljene frakcije smo analizirali z zgoraj opisano HPLC analitsko metodo. Frakcije s čistostjo 99.5% in večjo smo združili. V združenih frakcijah (7 ml) je bila vsebnost pravastatina 99.9%, HPLC čistost le-tega pa 99.8%.

Primer 2

Surovo natrijevo sol pravastatina (0.4 g, HPLC čistost 88%, vsebnost 85%) smo raztopili v 5 ml mobilne faze (destilirana voda), naravnali pH na 7 z vodno raztopino 0.2 M NaOH in filtrirali. Tako pripravljen vzorec smo nanegli na kolono Kromasil 100 C-18 kolono (EKA Chemicals AB, Švedska, velikost delcev 10 μm , velikost kolone 200 X 10 mm) za kromatografijo visoke ločljivosti. V

nadaljevanju smo spirali kolono z mobilno fazo, ki vsebuje 7% Triton-a X-100, s pretokom 1 ml/min. Absorbanco smo merili pri 260 nm, pri prvem porastu absorbcije pa smo pričeli zbirati frakcije po 0.5 ml. Dobljene frakcije smo analizirali z zgoraj opisano HPLC analitsko metodo. Frakcije s čistostjo 99.5% in večjo smo združili. V združenih frakcijah (3 ml) je bila vsebnost pravastatina 99.8%, HPLC čistost le-tega pa 99.7%.

Primer 3

0.6 g surove natrijeve soli pravastatina smo raztopili v 5 ml destilirane vode. Uporabili smo protokol, ki se je od protokola v Primeru 1 razlikoval le po mobilni fazi (30% vodna raztopina metanola) in dobili združene frakcije s HPLC čistostjo 99.8%.

Primer 4

Postopek opisan v Primeru 3 smo ponovili, pri čemer je bila koncentracija "izpodrivala" v mobilni fazi 14%. Frakcije, ki smo jih združili na osnovi v Primeru 1 opisanem kriteriju so imele vsebnost pravastatina 99.9%, HPLC čistost pa je bila 99.8%.

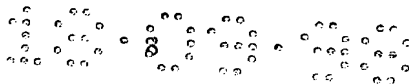
LEK,

tovarna farmacevtskih in kemičnih izdelkov, d.d.

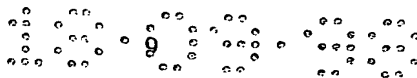


Lek, tovarna farmacevtskih
in kemičnih izdelkov, d.d.

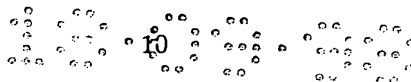


Patentni zahtevki:

1. Postopek pridobivanja inhibitorjev HMG-CoA reduktaze označen s tem, da ena izmed stopenj v procesu čiščenja surovih inhibitorjev HMG-CoA reduktaze zaobsega kromatografijo izpodrivanja.
2. Postopek opisan v Zahtevku 1, označen s tem, da je izbrani inhibitor HMG-CoA reduktaze mevastatin, pravastatin, lovastatin, simvastatin, fluvastatin ali atorvastatin.
3. Postopek opisan v Zahtevku 2, označen s tem, da je izbrani inhibitor HMG-CoA reduktaze lovastatin, fluvastatin, mevastatin ali simvastatin v obliki kisline oziroma njene soli.
4. Postopek opisan v Zahtevku 2, označen s tem, da je izbrani inhibitor HMG-CoA reduktaze pravastatin ali atorvastatin.
5. Postopek opisan v Zahtevku 2, označen s tem, da je izbrani inhibitor HMG-CoA reduktaze pravastatin.
6. Postopek opisan v Zahtevkih 1-5, označen s tem, da postopek čiščenja surovih inhibitorjev HMG-CoA reduktaze s kromatografijo izpodrivanja, vključuje naslednje stopnje:
 - a) kondicioniranje kromatografske kolone z izbrano mobilno fazo,
 - b) nanos v mobilni fazi raztopljenega inhibitorja HMG-CoA reduktaze,
 - c) nanos "izpodrivala" za izpodrivanje inhibitorja HMG-CoA reduktaze iz kolone in lovljenje frakcij,
 - d) analiza frakcij s analitsko HPLC in združitev frakcij po kvaliteti,
 - e) regeneracija - spiranje kolone z zmesjo alkohol/voda, da bi eluirali "izpodrivalo".
7. Postopek opisan v Zahtevku 6, označen s tem, da izberemo mobilno fazo med topili kot so voda, raztopina acetonitril/voda in vodne raztopine nižjih alkoholov ter pufri razredčenih organskih, halogeniranih organskih ali anorganskih kislin s kationi alkalijskih kovin, z amoniakom ali z amini.
8. Postopek opisan v Zahtevku 7, označen s tem, da je mobilna faza voda, raztopina acetonitril/voda ali vodna raztopina nižjih alkoholov.



9. Postopek opisan v Zahtevku 6, označen s tem, da je pH uporabljene mobilne faze med 4.5 in 8.5.
10. Postopek opisan v Zahtevku 9, označen s tem, da je pH uporabljene mobilne faze med 6.5 in 8.
11. Postopek opisan v Zahtevku 10, označen s tem, da je pH uporabljene mobilne faze 7.
12. Postopek opisan v Zahtevku 6, označen s tem, da je pretok mobilne faze skozi kromatografsko kolono pa med 0.26 do 6.5 ml/(min cm²)
13. Postopek opisan v Zahtevku 12, označen s tem, da je pretok mobilne faze skozi kromatografsko kolono pa med 0.65 in 3.3 ml/(min cm²).
14. Postopek opisan v Zahtevku 6, označen s tem, da po končani kromatografiji regeneriramo stacionarno fazo z 20-100 % vodno raztopino nižjega alkohola.
15. Postopek opisan v Zahtevku 6, označen s tem, da je stacionarna faza je reverzna faza.
16. Postopek opisan v Zahtevku 15, označen s tem, da je stacionarna faza naravna reverzna faza kot so silikageli z različno dolgimi alkilnimi verigami..
17. Postopek opisan v Zahtevku 15, označen s tem, da je stacionarna faza C-18 ali C-8.
18. Postopek opisan v Zahtevku 15, označen s tem, da je stacionarna faza sintetični zamreženi polimer naprimer iz stirena ali divinilbenzena.
19. Postopek opisan v Zahtevku 6, označen s tem, da je velikost delcev stacionarne faze med 3 in 20 µm.
20. Postopek opisan v Zahtevku 19, označen s tem, da je velikost delcev stacionarne faze med 7 in 15 µm.
21. Postopek opisan v Zahtevku 6, označen s tem, da se "izpodrivalo" izbere med alkoholi z vsaj C₄-verigo oziroma daljšo ali okso in diokso alkoholi
22. Postopek opisan v Zahtevku 21, označen s tem, da se "izpodrivalo" prednostno izbere med n-alkoholi z vsaj C₄-verigo oziroma daljšo
23. Postopek opisan v Zahtevku 21, označen s tem, da se "izpodrivalo" prednostno izbere med okso in diokso alkoholi



24. Postopek opisan v Zahtevku 6, označen s tem, da je koncentracija "izpodrivala" v mobilni fazi med 5 in 35 %, prednostno med 7 in 20 %.
25. Inhibitor HMG-CoA reduktaze s HPLC čistostjo višjo do 99.7%, označen s tem, da ena izmed stopenj v procesu čiščenja surovega inhibitorja HMG-CoA reduktaze zaobsega kromatografijo izpodrivanja.
26. Substanca po Zahtevku 25, pri čemer je inhibitor HMG-CoA reduktaze ena od substanc iz skupine lovastatin, simvastatin, pravastatin, atorvastatin, mevastatin in fluvastatin
27. Substanca po Zahtevku 25, pri čemer je inhibitor HMG-CoA reduktaze mevastatin, fluvastatin, lovastatin ali simvastatin v obliki kisline oziroma njene soli.
28. Substanca po Zahtevku 25, pri čemer je inhibitor HMG-CoA reduktaze pravastatin ali atorvastatin.
29. Substanca po Zahtevku 25, pri čemer je inhibitor HMG-CoA reduktaze pravastatin.

LEK,

tovarna farmacevtskih in kemičnih izdelkov, d.d.



*Lek, tovarna farmacevtskih
in kemičnih izdelkov, d.d.*

Izvleček

Lovastatin, pravastatin, simvastatin, mevastatin, atorvastatin njihovi derivati in analogi so poznani kot inhibitorji HMG-CoA reduktaze in se uporabljajo kot antihiperholesterolemiki. Večino jih proizvajajo s fermentacijo z mikroorganizmi različnih vrst, ki pripadajo rodovom *Aspergillus*, *Monascus*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Mucor* ali *Penicillium*, nekateri pa so rezultat obdelave fermentacijskih produktov z metodami kemijske sinteze oziroma so produkti totalne kemijske sinteze.

Čistost aktivne učinkovine je pomemben faktor pri proizvodnji varnega in učinkovitega zdravila, še posebej, če je potrebno jemanje zdravila na daljše obdobje, kot je to primer pri zdravljenju ali preprečevanju visokega nivoja holesterola v krvi. Akumulacija nečistoč iz zdravil z manjšo čistostjo lahko povzroča mnoge stranske učinke med zdravljenjem.

Predloženi izum se nanaša na nov industrijski postopek za izolacijo inhibitorjev HMG-CoA reduktaze z uporabo takoimenovane "displacement" kromatografije ali kromatografije izpodrivanja. Uporaba izuma nam omogoča pridobivanje inhibitorjev HMG-CoA reduktaze visoke čistosti, ob visokih izkoristkih, čim nižjih stroških in z ugodno ekološko bilanco.